云 南 植 物 研 究 5(4): 409—414, 1983
Acta Botanica Yunnanica

冠瘿组织中Nopaline合酶的定量研究

Ⅰ.不同植物冠瘿株中 Nopaline 合酶的定量比较*

王 钧 胡运乾 李 英 张 纯
(中国科学院昆明植物研究所)

摘 要

本文发展了一种根据 NADPH 消耗定量测定冠瘿组织粗酶提取液中 nopaline 合酶活性的方法。对于含 nopaline 型 Ti 质粒的土壤根癌杆菌菌株透发的马铃薯、向日葵、烟草和胡萝卜冠瘿系来说，由于不存在酶反应的促进剂或抑制剂，粗酶提取液中 nopaline 合酶的活性能够反映体内存在的此酶的酶量。用这个方法测定了四株土壤根癌杆菌菌株诱发的十六株植物冠瘿系的 nopaline 合酶活性，由不同菌株诱发的所有胡萝卜，烟草冠瘿素包括单细胞克隆的烟草冠瘿系，以 DNA 为单位的此酶量明显地低于向日葵和马铃薯冠瘿系。由此推测，不同宿主植物中nopaline合酶量的差异很大程度上取决于宿主植物本身。通过Ti质粒把外源基因导入不同植物可能有不同的命运。

前 言

由带Nopaline型Ti质粒的土壤根癌杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)诱发的植物冠瘿组织中,存在一种酶,它催化由α-酮戊二酸和L-精氨酸或乌氨酸还原缩合产 nopaline 和nopaline acid的反应,使冠瘿组织中累积 nopaline 和nopaline acid, [1、2]这个酶称为Nopaline合酶。它催化产生nopaline的反应式为:

$$
\begin{array}{l}
H_2N\text{-}\overset{\overset{NH}{\|}}{C}\text{-}NH(CH_2)_3\text{-}\underset{\underset{NH_2}{|}}{C}H\text{—}COOH \\
\quad + \\
HOOC\text{-}(CH_2)_2\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}COOH
\end{array}
+ \begin{array}{c} NADPH + H^+ \\ \text{或}(NADH) \end{array}
\rightleftharpoons
\begin{array}{l}
H_2N\text{-}\overset{\overset{NH}{\|}}{C}\text{-}NH(CH_2)_3\text{-}\underset{\underset{NH}{|}}{C}H\text{-}COOH \\
HOOC\text{-}(CH_2)_2\text{-}\overset{|}{C}H\text{-}COOH \\
+ NADP(\text{或}NAD) + H_2O
\end{array}
$$

密码这个酶的基因是整合在冠瘿细胞染色体上的[3]Ti质粒片段——T-DNA的一部

本文于1983年 3 月11日收到。
* 本工作得到国家科委及中国科学院科学基金会的资助，在此表示感谢。

份[4]。所以，Nopaline合酶是T-DNA的产物。通过对冠瘿组织中这个酶量的测定，有可能发现一些有助于了解冠瘿组织中T-DNA状况和表达规律的线索。

Otten和Schilperoot[5]曾通过测定 nopaline 生成提出了一种定性鉴别冠瘿组织中存在Nopaline合酶的方法。Goldmann[1]、Kemp[2] 等分别利用NADPH的消耗作为纯化nopaline合酶时定量追踪此酶的手段。我们适当改良了Goldmann 及 Kemp等人的方法，建立了一种可以定量反映冠瘿组织内 nopaline 合酶数量变迁的方法。应用这个方法发现，不同的土壤根癌杆菌菌株诱发的同种植物冠瘿无菌株系中 nopaline 合酶的量的差异，远小于同一菌株诱发的不同植物冠瘿的nopaline合酶量的差异。现将结果报道如下。

材料和方法

冠瘿株系和培养条件

本研究所用的冠瘿系有：由土壤根癌杆菌 S－1 菌株诱发的马铃薯冠瘿系 Ps_1、向日葵冠瘿系Hs_1、烟草冠瘿系 Tps_1、胡萝卜冠瘿系 Csy_1、Csy_3、Cs_1；土壤根癌杆菌702菌株诱发的向日葵冠瘿系 H_{702}、烟草冠瘿系 T_{s702} 和它的经原生质体得到的单细胞克隆株 $T_{s702\text{-}sc}$ 胡萝卜冠瘿系 C_{702R_1}、C_{702-2}；土壤根癌杆菌 C-58 菌株诱发的胡萝卜冠瘿系 C_{c58_3}、C_{c58y_1}、C_{c58y_3}；土壤根癌杆菌T_{37} 菌株诱发的向日葵冠瘿系 H_{T37}、H_{T37G}。大部份冠瘿系为本组所建[5]，烟草单细胞克隆株为本室张鉴铭赠，向日葵冠瘿系H_{T37G}为李向辉赠。烟草和向日葵冠瘿用MS基本培养基，胡萝卜冠瘿用 B_5 基本培养基，马铃薯冠瘿系用有机成份为Nitoch的MS基本培养基，25°C光照10小时/天。

粗酶提取液的制备

取转接后15—25天内的冠瘿鲜组织，切除转换时带来的老组织，加入冰冷的提取缓冲液〔0.1*M* Tris—HCl(pH8.0)、0.5*M*蔗糖、1 *mM*EDTA、14*mM* 巯基乙醇〕以 1 ：1（重量／体积）比例混合，在冰浴中用研钵匀浆，4°C下30000克力离心10分钟，上清液即粗酶提取液，立即或置冰筒数小时内测酶活性。

Nopaline合酶活性的定量测定

600μl 反应混合液，含16*mM* α-酮戊二酸、16*mM*L-精氨酸、0.12*mM* NADPH、12*mM*巯基乙醇，pH6.5的0.25*M*磷酸钾缓冲液，20μl粗酶提取液。反应在24—25°C条件下进行。以岛津 210A 型紫外分光光度计记录反应过程中 A_{339} 的降低速度，酶活性以每分钟氧化NADPH的nMol数量计量。

在实测时，α-酮戊二酸和 L-精氨酸分别制成钠盐和盐酸盐，以 0.25*M* 的磷酸缓冲液（pH6.5）配成960*mM*的母液；NADPH用 0.1*M* 的碳酸缓冲液（pH10）配成 72*mM* 的母液[7]；巯基乙醇的0.25*M* 磷酸缓冲液(pH6.5）配成 14.1*mM*的母液。反应分三阶段进行，每阶段 2 分钟。开始用510μl含巯基乙醇的磷酸缓冲液，50μl NADPH 母液和20μl粗酶提取液混合、反应；第二阶段向反应物中再加10μl α-酮戊二酸或L-精氨酸母液，混合、反应；第三阶段用10μl L-精氨酸或α-酮戊二酸母液，混合，反应。记录和计算各阶段的 $\triangle A_{339}$/分（对第一阶段、第二阶段反应测得的 $\triangle A_{339}$/分要进行酶量和NADPH浓度的体积校正)。Nopaline合酶的$\triangle A_{339}$/分＝第三次反应$\triangle A_{339}$/分—（含α-

酮戊二酸的第二次反应的$\triangle A_{339}$/分＋含L-精氨酸的第二次反应的$\triangle A_{339}$/分）＋第一次反应$\triangle A_{339}$/分。

结　果

1. 适于定量测定冠瘿组织粗酶提取液中Nopaline合酶活性方法的建立

反应方法的设计：

Nopaline合酶利用NADPH时的Km值为8μM，利用NADH时的Km值为它的百倍[2]。因此，只有NADPH可选作为利用分光光度计法定量测定此酶活性的还原剂。

此酶反应最适pH为6.5左右。在此pH下，NADPH不稳定。为了消除NADPH自发氧化及消除单加α-酮戊二酸或L-精氨酸时粗酶提取液中其它催化反应所引起的NADPH A_{339}的变化，我们设计了三阶段反应。即先测粗酶提取液和NADPH的反应，再测此混合液加α-酮戊二酸（或L-精氨酸）的反应。从各阶段反应的$\triangle A_{339}$/分，求出nopaline合酶活性。如粗酶提取液中nopaline合酶活性较高而α-酮戊二酸和L-精氨酸的副反应很小，可以改用二阶段反应，即先测粗酶提取液和α-酮戊二酸（或精氨酸）混合后NADPH的$\triangle A_{339}$/分值，再测此混合液加L-精氨酸(或α-酮戊二酸）后的$\triangle A_{339}$/分值，从其差值求出nopaline合酶本身的$\triangle A_{339}$/分值。

粗酶提取缓冲液和NADPH母液都偏碱性，而nopaline合酶反应最适pH为6.5左右。为防止反应液pH偏离最适pH，我们选用的反应缓冲液浓度比前人高，为0.25*M*，以增强它的缓冲性能。另外为防止反应液中酶及各基质浓度变化引起测定值的偏差，各阶段反应液体积的变化，减小到最大限度。

最适反应条件：

以马铃薯冠瘿系Ps150μl粗酶提取液，在25°C条件下，用二阶段反应法测得反应的最适条件是：pH6.50，α-酮戊二酸16*mM*，L-精氨酸16*mM*，NADPH0.12*mM*。这和Kemp等人[2]在纯化向日葵冠瘿nopaline合酶时所用条件稍异。他们用的L-精氨酸浓度偏低，而他们用的0.17*mM* NADPH浓度又偏高。这里NADPH浓度达到0.14*mM*以上时，对此酶反应就产生抑制作用。

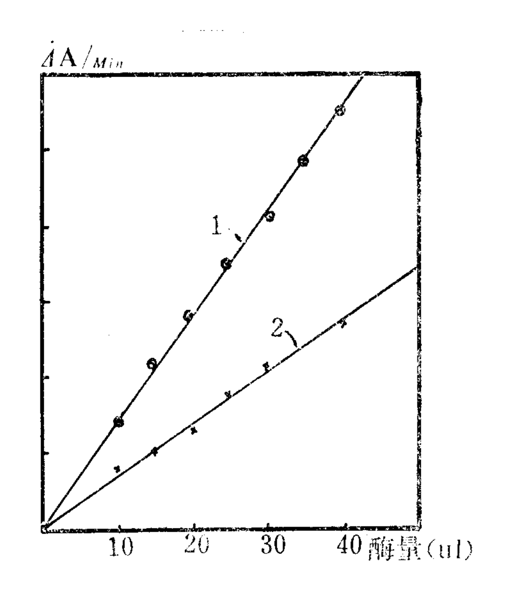


图1　不同酶量的$\triangle A_{339}$曲线　1.Ps1冠瘿系酶提取液；2.Hs1冠瘿系酶提取液。

在此条件下，用马铃薯，向日葵的冠瘿系证明，粗酶提取液在5—50μl间测得的此酶活性呈线性关系（图1）。表明这个条件适于定量测定冠瘿组织提取液中nopaline合酶的活性。

2. 不同植物冠瘿株中Nopaline合酶定量比较

粗酶提取液中，nopaline 合酶活性能反映出冠瘿组织中实际存在的nopaline合酶酶量：

图 2 是含高 nopaline 合酶活性的马铃薯和向日葵冠瘿组织的粗酶提取液和含低 nopaline 合酶活性的烟草、胡萝卜冠瘿组织粗酶提取液单独和混合后，测定 nopaline 合酶活性的记录图谱。反应用二阶段法进行，先加 L-精氨酸、NADPH 和酶液，2 分钟后加 α-酮戊二酸，反应温度 25°C，测定波长 399nm。从此记录可见，高活性的粗酶提取液和低活性的粗酶提取液混合后测出的 nopaline 合酶酶活性，实际上是此两种粗酶提取液原来分别测得的 nopaline 合酶活性之和。这表明，高活性的粗酶提取液并不含有特殊的促进反应的物质，而低活性的粗酶提取液也不含有特殊抑制反应或破坏酶蛋白的物质。由于向低活性酶提取液中附加更多的 NADPH 或加一些NADP未见对测得的酶活性产生多少影响，而含高活性的粗酶提取液中往往还含稍多的 nopaline；这也表明，粗酶提取物中原来残有的少量基质和产物对测得的酶活性并无多少影响。这样，粗酶提取液中测得的nopaline 合酶活性，能够反映出冠瘿组织中实际存在的nopaline 合酶的酶量。

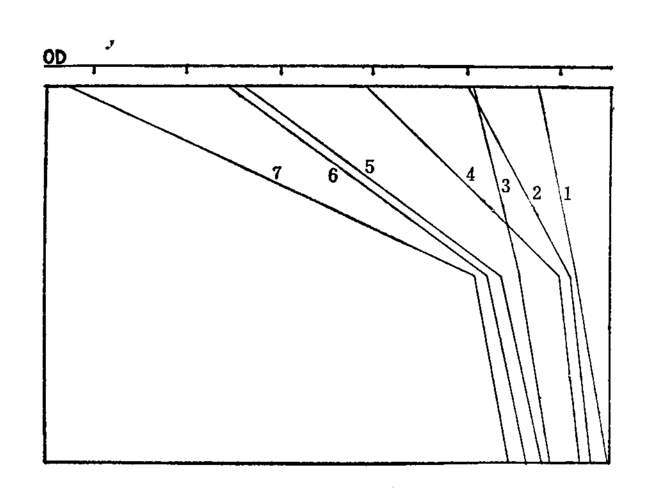


图 1　不同植物冠瘿系粗酶提出物及其混合液 nopaline 合酶反应过程中NADPH 量的变化1.加20μl 胡萝卜冠瘿系702R_1的酶液；2.加20μl 等体积混合的胡萝卜冠瘿系702 R_1 和向日葵冠瘿系702的酶液；3.加20μl 向日葵冠瘿系702的酶液；4.加10μl 烟草冠瘿系PS的酶液；5.加10μl马铃薯冠瘿系 S 的酶液；6.加20μl等体积混合的烟草冠瘿系 PS 和马铃薯冠瘿系 S 的酶液；7.加 20ul 马铃薯冠瘿系 S 的酶液。

不同冠瘿组织提取液中nopaline合酶活性的比较：

表 1 列出用上述方法以不同冠瘿组织提取液测得的 nopaline 合酶活性的数据。从这些数据可以看出：（1）由 S-1 菌株诱发的马铃薯、向日葵冠瘿粗酶提取液中nopaline合酶活性明显地高于相应的烟草、胡萝卜冠瘿系的粗酶提取液。（2）S-1、702和C-58三个菌株诱发的八个胡萝卜冠瘿株系粗酶提取液的 nopaline 活性除一个稍高外全都很低。（3）虽然冠瘿株系还不完全，但从现有的材料看各菌株诱发的胡萝卜、烟草冠瘿系，包括一株经原生质体单细胞克隆化的烟草冠瘿系T_{S702}—SC 的粗酶提取液的 nopaline 合酶活性都低，而向日葵、马铃薯冠瘿系的粗酶提取液比酶活性都明显地高。

表 1　　不同植物冠瘿组织粗酶提取液中Nopaline 合酶活性

	土豆	向日葵			烟草			
	P_{s1}	H_{s1}	H_{T37}	H_{702}	$T_{S702=SC}$	T_{s702}	T_{S702}II	T_{ps1}
μMol×10^3/min.g.f.w	613.0	377.0	126.0	219.2	1.000	47.00	31.00	-0.300
μ×10^3/mg.protein	99.51	62.11	23.51	33.01	0.376	17.28	13.31	／
μ×10^3/mg DNA	1230	605.1	267.1	403.7	1.874	34.55	56.02	／

	胡			萝		卜		
	C_{s1}	C_{sy1}	C_{sy3}	C_{c582}	C_{c58y1}	C_{c58y3}	C_{702-2}	C_{703-R1}
μMol×10³/min.g.f.w	0.000	0.246	8.000	1.000	7.000	14.00	11.00	4.000
μ×10³/mg.protein	0.000	0.072	5.634	0.487	6.776	6.776	6.866	3.530
μ×10³/mg.DNA	0.000	0.252	39.080	3.305	29.13	58.19	34.33	14.50

图3列出由S-1菌株诱发的四种植物冠瘿系粗酶提取物中原有 nopaline 的电泳图谱和经透析去nopaline 后用上述反应系统反应2小时后反应液中累积的 nopaline 电泳图谱。虽然这个方法是定性的，但由图谱仍然可以从 nopaline 的累积看出，由S-1菌株诱发的马铃薯冠瘿、向日葵冠瘿粗酶提取液比相应的烟草、胡萝卜冠瘿粗酶提取液有较高的 nopaline 合酶活性。同时也可看到，nopaline 合酶活性较高的冠瘿组织中原来累积较多的 nopaline。这也表明，粗酶提取液的 nopaline 合酶活性反映了冠瘿组织体内实际存在的nopaline合酶酶量。

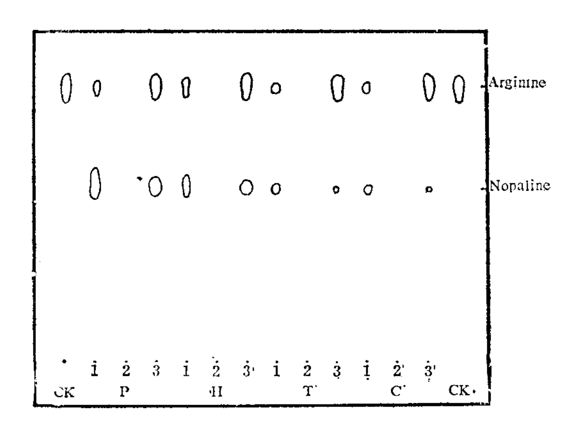


图3　Nopaline 合酶体外测定的产物电泳图
1.冠瘿组织的粗酶提取液10μl；2.经透析8.5小时除去 Nopaline 后的粗酶提取液10μl；3.反应混合液〔透析后的粗酶提取液50μl；L-精氨酸盐酸盐 10μl(960 mMol)；α-酮戊二酸二钠盐 10μl(960 mMol)；NAPPH₂⁺50μl (72mMol)；0.25Mol 磷酸缓冲液 (pH8.0 含 14.1 mMol巯基乙醇) 25μl混合后室温反应3小时〕10μl。
P—土豆冠瘿材料P_{s1}；　H—向日葵冠瘿材料H_{s1}；
T—烟草冠瘿材料T_{ps1}；C—胡萝卜冠瘿材料C_{sy1}。

讨　论

1.冠瘿组织中Nopaline合酶酶量的测定

在上述给定的最适 pH 和适当过量基质的条件下，根据α-酮戊二酸和L-精氨酸共存时酶促NADPH氧化初速度能够定量测定 nopaline 合酶活性。由于α-酮戊二酸或L-精氨酸在粗酶液中单独和NADPH 的副反应在我们所用四种植物中很弱，因此用二阶段反应就可得此 nopaline 合酶的近似活性。如果知道纯酶的此活力，也就可以从此活性求出粗酶提取液中nopaline合酶的实际含量。

至今还无植物组织中存在 nopaline 合酶反应抑制剂和促进剂的报导。由于这里所用四种植物冠瘿组织不存在这类干扰因子，所以这种粗酶提取液中 nopaline 合酶活力测定值能反映出体内实际存在的酶量。如果对其它植物冠瘿也证实无此类干扰因子，在提取时又注意保护酶蛋白，则这种粗酶提取液中 nopaline 合酶活性的测定，也可能反映出那

些植物冠瘿组织中实际存在的Nopaline合酶酶量。

但是，目前这个方法灵敏度还不够。烟草、胡萝卜冠瘿组织中虽然累积了少量的nopaline，但用这个方法测定粗酶提取液中的nopaline合酶活性，往往很弱，有时还得到微弱的负值。最近Goldmann等人[10]建立了免疫酶标法测定Octopine合酶的定量方法，灵敏度达到测1ng酶量。假定用Hack和Kemp[11]的纯Octopine合酶比活力数据推算，以我们类似的反应条件测定，其灵敏度相当于可测出NADPH的$\triangle A_{339}$/分值仅0.00026的酶量。如果对nopaline合酶也建起相应的免疫酶标定量技术，既可大大增高反应的特异性，又可大大提高测定灵敏度。

2.不同植物冠瘿株中Nopaline合酶酶量比较

如上所述，这里所用四种植物冠瘿系粗酶提取液的nopaline合酶活性能真实地反映出相应组织中存在的nopaline合酶的酶量。已知密码这个酶的基因位于T-DNA上，而T-DNA是整合在植物核基因组上的。因此，比较不同植物冠瘿粗酶提取液的以DNA为单位的nopaline合酶活性，有可能推测将外源基因通过Ti质粒导入不同植物后的命运。

表1所列数据虽不完整，但仍可看出：一方面，同一菌株诱发的不同植物的冠瘿系以DNA为单位的nopaline合酶活性相差甚大，马铃薯、向日葵冠瘿系的nopaline合酶活性远大于烟草和胡萝卜相应冠瘿系的此酶活性；另一方面，不同菌株所诱发的同种植物冠瘿系以DNA为单位的nopaline合酶活性，除少数稍有偏差外，相差甚小。由于这个规律十分明显，而单细胞克隆化的烟草冠瘿与其原始株系一样，粗酶提取液只有很低的nopaline合酶活性，而对烟草，胡萝卜冠瘿即使改变提取缓冲液成份，例如用含聚乙烯吡咯烷酮的提取缓冲液或用缓冲性能更强的提取缓冲液都无法提高测出的酶活性（数据未列出）。这样，烟草、胡萝卜冠瘿的低nopaline合酶活性，就不能用它们的组织含大量正常细胞等简单地进行解释。

显然，nopaline合酶在冠瘿组织中的含量应与T-DNA结构及植物本身两方面有关。T-DNA带多个基因，nopaline合酶基因在植物组织中是表达较强烈的基因[12]，表明它具有适于在植物中表达的结构。冠瘿组织中T-DNA是利用植物的RNA聚合酶进行转录的[13]。我们亦注意到同一冠瘿组织在不同的生理状态下nopaline合酶酶量有异（待发表），表明植物本身对T-DNA表达有影响。从这个角度分析表1的结果可见，植物种类本身在决定冠瘿组织中nopaline合酶含量上有巨大作用。

虽然已知不同土壤根癌杆菌菌株的nopaline型Ti质粒结构差异很大[14]，但在T-DNA上的nopaline合酶基因及其调控部份有多少差异还不清楚。这里不同菌株诱发的同种植物冠瘿中nopaline合酶含量的差异，有可能暗示这些菌株Ti质粒nopaline合酶基因及其调控部位有差异。然而，各菌株诱发的不同植物的冠瘿中nopaline合酶酶量随所用植物的种类不同而相差甚大则暗示，一旦以Ti质粒为载体把外源基因引入植物，此基因在不同植物中的命运可能很不相同。这或许是不同植物染色质DNA有不同数量可被T-DNA整合的位点，从而不同植物冠瘿有不同T-DNA拷贝数；这或许是不同植物有不同强度的降解外源蛋白的系统，从而nopaline合酶在不同植物中稳定性有异；这也还可能是不同植物的转录、转译系统对nopaline合酶基因的匹配程度有异，或不同植物调控表达的方式有异，从而nopaline合酶基因在不同植物中表达程度有异引起上述这些结果

的。如经研究搞清同种 Ti 质粒中nopaline合酶基因在不同植物中命运差异的真正原因，则在利用 Ti 质粒导入外源基因时，就可能根据被导入此基因的植物的特点，适当调整T-DNA或外源基因的碱基顺序，达到使它在此植物中按人类要求表达的目的。

参 考 文 献

〔1〕 Goldmann, A., 1977: *Pl. Sci. Lett.*, 10: 49—58。

〔2〕 Kemp, J. D., et al., 1979: *Biochemistry*, 18: 3755—3760。

〔3〕 Yadav, N. S., et al., 1980: *Nature* 287: 458—461。

〔4〕 Holster, M., et al., 1980: *Plasmid* 3: 212—230。

〔5〕 Otten, L. A. B. M., & Schilperoort, R. A., 1978: *Biochem. Biophy. Acta*.527: 497—500。

〔6〕 王　钧等，1981：云南植物研究，3：441—447。

〔7〕 Lowry, O. H., et al., 1961: *J. Biol. Chem.* 236: 2756—2759。

〔8〕 Bradford, M.M., 1978: *Anal. Biochem.* 72: 248—254。

〔9〕 Giles, K. W., et al., 1965: *Nature* 206: 93。

〔10〕 Goldmann, A., et al., 1981: *FEBS Lett.* 130: 213—216。

〔11〕 Hock, E., & Kemp. J. D., 1980: *Pl. Physiol.* 65: 945—955。

〔12〕 Yang, F., et al., 1980: *Mol. Gen. Genet.* 177: 707—714。

〔13 Willmitzer, L., et al., 1981: *Nucleic Acids Research* 9: 480165—4812。

QUANTITATIVE STUDY OF NOPALINE SYNTHASE IN PLANT CROWN GALLS I QUANTITATIVE COMPARISION OF NOPALINE SYNTHASE IN CROWN GALL LINES OF DIFFERENT PLANT SPECIES

Wang Jun, Hu Yunqian, Li Ying and Zhang Chun

Abstract

A quantitative method for determination of the activity of nopaline synthase in the crude enzyme extract of crown gall by measurement of the expense of NADPH was established. The activity of this enzyme in vitro for the crown gall lines of potato, sunflower, tobacco and carrot induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying nopaline type Ti plasmid can represent its quantity in vivo for no any activitor or inhibitor of this enzyme for sixteen plant crown gall lines induced by four *A.tumefaciens* strains was measured by this method. The quantities of this enzyme in all crown gall lines of carrot and tobacco including one of the single cell line of tobacco crown gall on the basis of DNA unit are less viously than the quantity of it in all crown gall lines of sunflower and potato induced by simillar *A. tumefaciens* strains. The different quantity of no-paline synthase in different host plants is determined to a great extend by the different plants thomselves. It is possiblat that a exterior gene incorporated into plant though Ti plasmid will get different results in different plants.